

© WPI / DERWENT

AN - 1979-23055B [25]

TI - Guanosine-5'-phosphoric acid prodn. - by culturing suitable variety of Bacillus microorganism, prod. useful as seasoning

AB - J54020195 Method comprises culturing a variety of Bacillus which shows the requisition for adenine, the resistance for decoinin or methioninesulphoxide and the producibility for guanosine-5'-monophosphoric acid (GMP) and collecting the GMP accumulated in the culture medium.

- Typical varieties of Bacillus are B. subtilis AJ11160 (FERM-P 4122), B. subtilis AJ11161 (FERM-P 4123), etc. and they are induced from B. subtilis IAM 1523 through B. subtilis AJ11159 (FERM-P 4121) by treating it with N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine, etc. Culture is at 28-37 degrees C at pH 4-7.5 for 1-4 days aerobically in a culture medium contg. a carbon source, nitrogen source, inorganic ions, micronutrients and adenine.

- After the culture, bacterial body is removed by centrifuging and the filtrate is adjusted to pH 1.5 with hydrochloric acid. Then, the soln. is treated with H-form cation exchange resin to adsorb the GMP.

IW - GUANOSINE PHOSPHORIC ACID PRODUCE CULTURE SUIT VARIETY  
BACILLUS MICROORGANISM PRODUCT USEFUL SEASON

PN - JP54020195/A 19790215/DW197912 000pp

- JP56012438B B 19810320 DW198116 000pp

IC - C12D13/00 ;C12P19/32 ;C12R1/12

MC - B04-B03 B12-J01 D05-C05 E05-G07

DC - B02 D13 D16 E11

PA - (AJIN ) AJINOMOTO KK

PR - JP19770084393 19770714

⑨日本国特許庁  
公開特許公報

⑩特許出願公開  
昭54—20195

⑪Int. Cl.<sup>2</sup>  
C 12 D 13/00

識別記号  
1 4 5

⑫日本分類  
36(2) D 531.42

庁内整理番号  
6760-4B

⑬公開 昭和54年(1979)2月15日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭グアノシン-5'-モノリン酸の製造法

⑮発明者 江井仁

逗子市池子2丁目30-2

同 滝波弘一

横浜市港北区篠原台町3-16-310

⑯特 願 昭52-84393

⑰出 願 昭52(1977)7月14日

⑱発明者 佐藤勝明

横須賀市馬堀海岸1-1

同 松井裕

川崎市幸区鹿島田958

⑲出願人 味の素株式会社

東京都中央区京橋一丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

グアノシン-5'-モノリン酸の製造法

2. 特許請求の範囲

アデニン要求性を有しさらにデコイニンまたはメチオニンスルホキソドに耐性を有し、かつグアノシン-5'-モノリン酸生産能を有するバチルス属の変異株を培養し、培地中に生成蓄積したグアノシン-5'-モノリン酸を採取することを特徴とするグアノシン-5'-モノリン酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

この発明はグアノシン-5'-モノリン酸(以下OMPと記す)の製造法に関する。

OMPは調味料として使用されていて、バチルス属のアデニン要求性変異株が培地中に生成することが知られている。

本発明者らはこのようなOMPの効率のよい製造法を見出すべく研究した結果、アデニン要求性を有しさらにデコイニンまたはメチオニンスルホキソドに耐性を有するバチルス属の変異株の中から

から若狭のOMPを培地中に生成蓄積する能力を有する変異株を見出した。この発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

本発明の方法において用いる変異株は、上記のような、バチルス属の微生物より人工的に変異誘導したアデニン要求性を有し、デコイニンまたはメチオニンスルホキソドに耐性を有する変異株である。

このうちスクレオチダーゼ活性が低下した変異株よりさらにOMPの収率が高い菌株が得られる場合が多い。

具体的には次の変異株がある。

バチルス・ズブナリス AJ 11160 (PERM-P 4/22)

(アデニン要求、デコイニン耐性)

バチルス・ズブナリス AJ 11161 (PERM-P 4/23)

(アデニン要求、デコイニン耐性、メチオニンスルホキソド耐性)

このような変異株を誘導する方法はN-メチル-N-ニトロ-N-ニトログアニジン等で処理する等の通常の方法でよい。変異処理した菌株より

リ本発明の薬剤耐性株を分離する方法は、当該薬剤を親株が生育しえないような量を含む培地に生育しうるような菌株を選択すればよい。

具体的にはこれらの変異株は以下の方法で採取した。

バチルス・ズブテリス (IAM-1523) よりアデニン要求性を有する AJ 11159 (PERM-P 4/21) を誘導した。これよりさらに N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで (10007/μl、0℃) 5 分間処理し、下記の基本培地にデコイニン 10007/μl を添加したプレートに塗布し、2～10 日間 34℃ で培養して、出現したコロニーの中から AJ 11160 を選別した。

#### <基本培地>

|          |           |
|----------|-----------|
| グルコース    | 2 g/μl    |
| 塩化アンモン   | 0.5 g/μl  |
| 硫酸第 1 カリ | 0.4 g/μl  |
| 硫酸マグネシウム | 0.02 g/μl |
| クエン酸ソーダ  | 0.05 g/μl |
| L-グルタミン酸 | 0.1 g/μl  |

表示した (第 1 表)

次に AJ 11160 を更に N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン 10007/μl で、0℃、50 分間処理して、上記の基本培地に 5007/μl のメチオニンスルホキンドを添加したプレートに塗布し 4 日間 34℃ で培養して出現したコロニーを採取し、その内より AJ 11161 を選別した。AJ 11160 と AJ 11161 のメチオニンスルホキンドに対する生育度を第 2 表に記す。

第 2 表 メチオニンスルホキンドに対する生育度

| メチオニンスルホキンド | AJ 11160 | AJ 11161 |
|-------------|----------|----------|
| 0           | 100      | 100      |
| 100         | 30       | 100      |
| 500         | 0        | 100      |
| 1000        | 0        | 50       |

実験方法は前述のデコイニンにおける場合と同様の方法に従った。

このような変異株を培養する方法は通常の炭素

特開第 54-20195 (2)

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 1 mg/μl  |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 1 mg/μl  |
| アデニン                                 | 10 mg/μl |
| PH(KOH)                              | 2.5      |
| 寒 天                                  | 2.0 g/μl |

AJ 11159 と AJ 11160 のデコイニンに対する生育度を第 1 表に記す。

第 1 表 デコイニンに対する生育度

| デコイニン | AJ 11159 | AJ 11160 |
|-------|----------|----------|
| 0     | 100 %    | 100 %    |
| 100   | 60       | 100      |
| 1000  | 0        | 100      |
| 2000  | 0        | 100      |

実験方法は、前記の基本培地 (寒天は除く) にデコイニンを 100、1000 または 20007/μl を添加した液体培地 3 μl を入れた小型試験管に AJ 11159 または AJ 11160 を約 10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup> 個接種し、34℃ にて振盪培養した。24 時間後の生育を測定し、デコイニン無添加区との相対比 (%) で

源、炭素源、無機イオン、さらに必要な場合にはその他の有機微量栄養素を含む通常の培地である。もちろんアデニン要求性を満足すべきアデニン等の物質が添加される。炭素源としてはグルコース等の炭水化物が最も望ましい。炭素源としてはアンモニウム塩、アンモニアガス、アンモニア水等が使用できる。無機イオンとしてはマグネシウムイオン、カリウムイオン、硫酸イオン等が適宜使用される。さらに必要によりビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を適宜添加する。

培養は好気的条件下に、望ましくは pH 4 ないし 7.5、温度は 28 ないし 37℃ の範囲に制御しつつ行い、よりよい結果が得られる。かくして 1 ないし 4 日間も培養を行えば培地中に蓄量の OMP が蓄積される。

培養液から OMP を採取する方法は、イオン交換樹脂を用いる等の通常の方法でよい。

実施例 1

第 3 表

| シード培地                                |         | 主発酵培地                                |          |
|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|----------|
| グルコース                                | 20 g/dl | グルコース                                | 8 g/dl   |
| 酵母エキス                                | 0.5 "   | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 1.5 "    |
| 食塩                                   | 0.1 "   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1 "      |
| アデニン                                 | 0.02 "  | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.5 "    |
| 大豆蛋白加水分解液                            | 4 ml/dl | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 1 mg/dl  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1 g/dl  | MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 1 "      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.5 "   | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.2 g/dl |
| pH 7.5 (KOH)                         |         | アデニン                                 | 0.02 "   |
| 115℃、10分殺菌                           |         | 大豆蛋白加水分解液                            | 4 ml/dl  |
|                                      |         | pH 6.5 (KOH)                         |          |
|                                      |         | 115℃、10分殺菌                           |          |

第3表に示すシード培地 50 ml を入れた 500 ml 容フラスコに第4表に示す菌株を1白金耳ずつ接種し、34℃にて16時間培養した。この培養液を、第3表に示す主発酵培地 20 ml を入れた 500 ml 容フラスコに1 ml 添加して34℃にて

72時間培養した。この培養液中のOMPを高速度液体クロマトグラフィーにて定量したところ、第4表に示す量のOMPが生成着積した。

AJ 11161 の培養液 10 l より固体を濾過分離し、濾液を塩酸で pH 1.5 にし、「ダイアイオン SK #1」(H型)の樹脂柱に通した。ついで、蒸留水を流し、濾液に於いて流出される水洗初期の流出液のOMPを含む分画を集め、水酸化ナトリウムで pH 7.2 に調整した。これを減圧蒸縮後、冷却して GMP·2Na·7.5H<sub>2</sub>O の結晶 10 g を得た。

第 4 表

| 菌 株                 | GMP (GMP·2Na·7.5H <sub>2</sub> O として)<br>着積量 (g/l) |
|---------------------|--|
| バチルス・ズブチリス AJ 11159 | 0.2  |
| " " AJ 11160        | 2.0  |
| " " AJ 11161        | 2.5  |

特許出願人 味の素株式会社